Aus dem Institut für Veterinär-Parasitologie der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. J. Boch

VERSUCHE ZUR FESTSTELLUNG DER BRAUCHBARKEIT DER KBR FÜR DIE FASCIOLA HEPATICA-DIAGNOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Pramod Behari Mathur
Tierarzt aus Madanpur/Indien

Berlin 1966

Journal Nr. 550

Aus dem Institut für Veterinär-Parasitologie der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. J. Boch

VERSUCHE ZUR FESTSTELLUNG DER BRAUCHBARKEIT DER KBR FÜR DIE FASCIOLA HEPATICA-DIAGNOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Pramod Behari Mathur
Tierarzt aus Madanpur/Indien

Berlin 1966

Journal Nr. 550

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Heidrich

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1966

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Serologische und allergische Verfahren zum Nachweis einer Leberegelinfektion (anhand der Literatur)	2
III.	Eigene Untersuchungen	7
	A. Material und Methodik	7
	B. Ergebnisse	9
	1. Prüfung der Seren immunisierter Kaninchen mit der KBR	9
	2. Prüfung der Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Kaninchen mit der KBR	14
	3. Prüfung der Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe mit der KBR	17
IV.	Besprechung der Ergebnisse	23
V.	Zusammenfassung	25
VI.	Literaturverzeichnis	26
	Lebenslauf	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0042

I. Einleitung

Die Fasciolose ist eine beinahe weltweit verbreitete Krankheit der Rinder, Schafe und Wildtiere und hat auch in meinem Heimatland Indien eine große wirtschaftliche Bedeutung.

Sobald die Leberegel in den großen Gallengängen geschlechtsreif geworden sind, lassen sich ihre Eier bei der Kotuntersuchung durch entsprechende Anreicherungsverfahren nachweisen. Klinische Symptome treten aber bereits 5 - 6 Wochen nach der stattgehabten Infektion auf, wenn die jungen Trematoden das Leberparenchym durchwandern. Eine derartige akute Fasciolose lässt sich aber mit koprologischen Verfahren parasitologisch nicht sichern. Man versucht deshalb schon lange, mit Hilfe serologischer Methoden den Leberegelbefall frühzeitig, insbesondere zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Krankheitserscheinungen, nachzuweisen.

Diese von vielen Seiten versuchten Verfahren sind aber bisher noch nicht zuverlässig genug. Herr Prof. Dr. Boch stellte mir daher die Aufgabe, erneut mit der Komplementbindungsreaktion Seren von künstlich mit Fasciola hepatica infizierten Kaninchen und Schafen zu prüfen.

II. Serologische und allergische Verfahren zum Nachweis einer Leberegelinfektion (anhand der Literatur)

Im wesentlichen werden die Komplementbindungsreaktion, die Praezipitation sowie Intradermalteste zum serologischen bzw. allergischen Nachweis einer bestehenden Fasciola-Infektion verwendet. Dabei befassen sich zahlreiche Arbeiten mit der Gewinnung und Erprobung einzelner Antigene.

Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) diagnostizierten erstmals WEINBERG (1909) und PACCANARO (1909) den Leberegelbefall bei Schafen. Später erzielte SERVANTIE (1921) bei 17 von 25 infizierten Schafen eine positive Reaktion mit einem alkoholischen Extrakt aus geschlechtsreifen Fascioliden. Ein menschliches Serum reagierte ebenfalls. Allerdings war die Reaktion nicht spezifisch, da dasselbe Serum auch mit Echinokokkenantigen reagierte. FAIRLY und WILLIAMS (1923) berichteten über positive Reaktionen bei 16 von 20 infizierten Schafen. Nach BROCQ-ROUSSAU und Mitarb. (1923) reagierten nicht nur 86 % der Seren infizierter Schafe, sondern auch 60 % der Seren von nicht befallenen Tieren positiv. Ähnliche Ergebnisse erzielten HOFFMANN und RIVERA (1929), so daß ein gewisser Zweifel an der Spezifität und Zuverlässigkeit dieser Methode auftrat.

MINNING (1951) befasste sich mit der Verbesserung der Antigengewinnung. In vergleichenden Versuchen bewährte sich jedoch ein alkoholischer Extrakt des großen Leberegels am besten für die KBR. Ein Extrakt in physiologischer Kochsalzlösung brachte zwar brauchbare Ergebnisse, doch war dieses Antigen nicht haltbar und damit für spätere Routineuntersuchungen doch ungeeignet. ELIAKIM und DAVIES (1954) prüften ebenfalls verschiedene Extrakte sowohl von Schistosoma mansoni als auch von Fasciola hepatica. Die Auszüge von adulten S. mansoni in Cakos, Alkohol-Äther und absolutem Alkohol (nach vorheriger Azetonextraktion) besaßen alle

eine hohe Antigenität. Allerdings war der Cakos-Extrakt anscheinend spezifischer, aber doch weniger empfindlich. Der Alkohol-Äther-Extrakt von F. hepatica besaß auch antigene Eigenschaften wie der Alkohol-Extrakt (nach vorheriger Azetonextraktion). Die erzielten Titer waren aber so niedrig, daß die beiden Antigene für eine zuverlässige KBR ausscheiden mußten.

Schon 4 Jahre zuvor hatten MINNING und VOGEL (1950) berichtet, daß Seren von 3 Kindern mit Fasciolose bei Verwendung eines alkoholischen Leberegelaxtraktes eine positive KBR zeigten. In einem Fall blieb die KBR noch 6 Monate nach der parasitologischen und klinischen Heilung positiv. Es konnten aber auch spezifische Ergebnisse mit einem Extrakt in physiologischer Kochsalzlösung erzielt werden. Es ist interessant, daß Fasciola-Seren nicht mit Bilharzia-Wurm-Extrakten reagierten. Dagegen war das Ergebnis mit Bilharzia-Zerkarien-Extrakt sowie mit einem Extrakt aus den Verdauungsdrüsen von Schnecken, die mit verschiedenen einheimischen Trematoden infiziert waren, positiv.

MINNING und FUHRMANN (1955) bestätigten erneut, daß der alkoholische Vollextrakt von F. hepatica sich zum Nachweis von Antikörpern mit der KBR am besten eignete. Das Antigen aus der Proteinfraktion reagierte schwächer. Der Extrakt aus der Kohlehydratfraktion besaß keine antigenen Eigenschaften. Dagegen war die mit Chloroform extrahierte Lipoidfraktion auswertbar. CARVAO GOMES und SILVA XAVIER (1956) konnten mit den Globulin- und Glukoidantigenen bei einem Patienten die bestehende F. hepatica-Infektion nicht diagnostizieren. Dagegen erreichten sie mit dem durch die Fairly-Methode gewonnenen Ganzwurm-Antigen beim gleichen Patienten einen KBR-Titer von 1:150. Auch für den Hauttest war dieses Antigen geeignet, da es schnell eine positive Reaktion ergab.

MINNING und Mitarb. (1958) benutzten schließlich erfolgreich als Antigen für die KBR Stoffwechselprodukte von

Fasciola hepatica, die sie in einem Kulturmedium längere Zeit gehalten hatten. Dabei trat keine Gruppenreaktion mit Seren von Schistosoma-infizierten Menschen auf.

BÉNEX und Mitarb. (1959) verwendeten Antigen aus adulten Fasciola und Dicrocoelium. Sie erreichten damit positive KBR-Reaktionen mit 27 Seren von Schafen, deren Leberegelbefall durch die Kotuntersuchung belegt war. Der Test war auch positiv bei 9 von 13 Schafen und bei 9 von 31 Lämmern, die keine Fasciola-Eier mit dem Kot ausschieden. Da Schlachtungen nicht durchgeführt wurden, lässt sich aus diesen Beobachtungen nur wenig über die Brauchbarkeit des Antigens zum Nachweis frischer Infektionen aussagen.

Neben der KBR wurde vielfach zur Feststellung einer Leberegelinfektion der Präzipitationstest angewendet bzw. auf seine Zuverlässigkeit überprüft. Auch hier kommt der Herstellung und Auswahl eines entsprechenden Antigens für das Gelingen des Testes eine wesentliche Bedeutung zu.

Nach TRAVIŃSKI (1937) präzipitierten alle Seren von 161 infizierten Schafen und Rindern mit einem F. hepatica-Antigen, dessen Herstellung allerdings im einzelnen nicht definiert ist. STICKDORN (1939) verwendete 5 verschiedene Antigene. Zur Gewinnung von Antigen I wurden Leberegel, deren Darminhalt entleert wurde, getrocknet und in physiologischer Kochsalzlösung 10 Tage im Kühlschrank extrahiert und danach bei 55°C in 45 Minuten sterilisiert. Für sein Antigen II wurde Äther als Extraktionsmittel verwendet. Antigen III wurde wie Antigen I hergestellt, aber nur 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Antigene IV und V gewann er, indem 0,2 g pulverisierte Fasciola mit 20 ml einer 2 %igen Antiforminlösung gemischt, kurz geschüttelt und anschließend 1 Stunde bei 37°C (bzw. Antigen V 5 Minuten bei 90°C) gehalten wurden. Mit Antigen I wurden 81,5 % der Leberegel-Infektionen nachgewiesen. Antigen V erwies sich mit nur 62,9 % am ungeeignetsten.

SZAFLARSKI (1946) hält den Präzipitationstest auch zur Diagnose subklinischer Fälle für geeignet. Nach ICHIHARA und Mitarb. (1956) bewährte sich der Test bei Rindern und Ziegen in 90 % der Fälle als spezifisch. Von 5 verschiedenen Antigenen erwies sich bei ihren Untersuchungen ein Gemisch der Polysaccharid- und Lipidfraktion am zuverlässigsten.

BABADSHANOW und TUCHMANJANZ (1958) gewannen ein eiweißfreies Leberegel-Antigen mit hohem Polysaccharidgehalt, das mit Hochimmunseren von Kaninchen eine spezifische Präzipitation und KBR ergab.

Schließlich wiesen SPUHLER und Mitarb. (1958) auch mit dem Agardiffusionstest Antikörper in Seren leberegelbefallener Schlachtrinder nach. Der Test verlief bei massiven Infektionen zu 88 % positiv. Nur leichte Invasionen wurden dagegen nicht erfaßt.

Zur Durchführung des Hauttestes verwendeten SIEVERS und OYARZUN (1932) mit gutem Erfolg einen Vollextrakt aus Fasciola hepatica. Daraufhin untersuchte WAGNER (1935) leberegelbefallene Schafe. Doch war dieser Hauttest nicht spezifisch, so daß er die gemeinsame Anwendung von Kutanprobe und KBR vorschlägt. Auch CURASSON (1935) war mit dem Hauttest nicht zufrieden.

Dagegen wollen AYGÜN und BASKAYA (1939) im Hauttest mit einem Ätherextrakt bei Fasciola-infizierten Schafen und Ziegen bessere und zuverlässigere Ergebnisse erreicht haben als durch die Kotuntersuchung. In gleicher Weise äußern sich MAZOTTI (1942 und 1948) und MORENAS (1943 und 1944) positiv zum Hauttest beim Menschen. Sie verwendeten NaCl- bzw. Glyzerinextrakte geschlechtsreifer Trematoden als Antigen.

OLIVER GONZÁLEZ und Mitarb. (1950) testeten Rinder durch intradermale Injektion eines Fasciola-Antigens in die Schwanzfalte, wobei positive Reaktionen bereits in 30 Minuten erschienen. Ebenso fand SOBIECH (1951) diesen Test für Rinder spezifisch. Bereits vor Ablauf der Präpatentzeit ließen sich Leberegel-Infektionen nachweisen. Ebenso berichten SZAFLARSKI und NAWROCKI (1951) von guten Ergebnissen

mit einer Polysaccharidfraktion von F. hepatica als Antigen bei Intradermal-Palpebraltesten in einer Schafherde. Ähnliche Erfolge erzielten ONO und WATANABE (1956).

RIVERA-ANAYA und Mitarb. (1953) verglichen Hauttest und Präzipitationsreaktion bei 219 Rindern. Die Kutanprobe mit 94 - 98 % Erfolg war der Präzipitation (60 %) in ihrem Aussagewert überlegen. SOULSBY (1954) bestätigte ähnliche Erfolge mit dem Intradermaltest durch postmortale Untersuchungen und befürwortet dessen Anwendung in der Routinediagnostik.

Immer wieder aber weisen die Untersucher daraufhin, daß auch für das positive Ergebnis beim Hauttest die richtige Herstellung des Antigens ausschlaggebend ist. So geht aus der Arbeit von CARVAO GOMES und SILVA XAVIER (1956) hervor, daß Kutanprobe und KBR mit einem Globulin- und einem Glucidantigen für eine Diagnose wertlos, daß nur mit Vollextrakt aus geschlechtsreifen Würmern brauchbare Resultate zu erzielen sind. Demgegenüber konnten WIKERHAUSER und BARTULIĆ (1961) mit Stoffwechselantigen 79,5 % und mit Vollextrakt nur 63 % der infizierten Tiere ermitteln, während Polysaccharidfraktion mit 39 % versagte. PATNAIK und DAS (1961) wiederum erzielten bei 40 Rindern verlässliche Ergebnisse mit einem Antigen, das durch Trocknung adulter Leberegel bei 50°C hergestellt und in Dosen von 0,3 - 0,5 ml verwendet wurde. PAUTRIZEL und Mitarb. (1962) schließlich konnten mit einem lipidfreien Antigen im Hauttest die Leberegelinfektion sichern.

Es besteht also noch keine Einigkeit darüber, ob die Komplementbindungsreaktion sowie die Präzipitation und der Hauttest in gleicher Weise geeignet sind, eine auch nur wenige Wochen bestehende Leberegelinfektion bei Tieren mit Sicherheit zu diagnostizieren. Auch variieren die bisherigen Angaben stark, welche Antigenzubereitung für die einzelnen Methoden die wirksamste ist. Es erschien daher als zweckmässig, mich in meinen eigenen Versuchen nur auf wenige bisher übliche Antigene zu beschränken und diese ausschließlich in einem Verfahren, nämlich der KBR zu überprüfen.

III. Eigene Untersuchungen

Meine an 8 etwa 20 - 25 kg schweren Schafen und an 31 Kaninchen im Alter von 6 - 8 Wochen durchgeführten Untersuchungen sollten die Wirksamkeit verschieden hergestellter Fasciola hepatica-Antigene vergleichend aufzeigen und gleichzeitig deren Brauchbarkeit für die KBR erhärten. Ferner wollte ich die Zuverlässigkeit der Komplementbindungsreaktion für die Diagnostizierung frischer Leberegelinfektionen vor Ablauf der Präpatentzeit bestätigen.

A. Material und Methodik

Zur Gewinnung von Fasciola-Antigenen habe ich adulte Leberegel aus den Gallengängen von Schlachtrindern gesammelt. Die Parasiten wurden bei einer Temperatur von 4°C in steriler physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschen, in kleine Stücke geschnitten und in einem Glashomogenisator 5 Minuten lang zerkleinert. Anschließend wurde das Material 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung bei 4°C extrahiert und bei 3500 U/min. 1 Stunde lang zentrifugiert. Den Überstand bewahrte ich nach Zugabe von 400 I. E. Penicillin-Streptomycin-Suspension pro ml in der Tiefkühltruhe bei -20°C auf.

Insgesamt stellte ich für meine vergleichenden Untersuchungen 4 verschiedene Antigene, jedoch stets aus adulten Leberegeln her. Antigen I war der Vollextrakt von 25 adulten Fascioliden in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung. Als Antigen II verwendete ich den Extrakt von 50 adulten Leberegeln, denen zuvor die Genitalien herauspräpariert worden waren, ebenfalls in 100 ml physiol. NaCl. Zur Herstellung von Antigen III wurden 25 lebende Fascioliden 16 Stunden lang bei 37°C in 100 ml physiol. NaCl unter Zusatz von 400 I. E. Penicillin-Streptomycin pro ml aufbewahrt. Das Kulturmedium wurde dann zentrifugiert und der Überstand als Antigen verwendet. Als Antigen IV benutzte ich den von MINNING und VÓGEL (1950) beschriebenen Alkoholextrakt.

Frisch aus der Leber isolierte Trematoden wurden bei 28°C im Luftstrom eines Klimagerätes getrocknet und anschließend pulverisiert. 1/4 g der so gewonnenen Trockenmasse wurde mit 25 ml absolutem Alkohol 48 Stunden bei 37°C extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand im Luftstrom auf 1/3 des Ursprungsvolumens eingeengt.

Zur Herstellung von Hochimmunseren verwendete ich 21 Kaninchen, die in 3 Gruppen zu je 7 Tieren eingeteilt wurden. In Gruppe I wurden jeweils 2 Tieren 3mal je 1 ml, 2 ml bzw. 3 ml Antigen I i. p. injiziert. Das 7. Tier in jeder Gruppe lief als Kontrolle. In Gruppe II erhielten 3 Kaninchen je 2 ml Antigen II und komplettes Freund'sches Adjuvans. Den anderen 3 Versuchstieren injizierte ich 3mal je 1 ml, 2 ml bzw. 3 ml Antigen II i. p. ohne Adjuvans. Die Kaninchen der Gruppe III wurden behandelt wie diejenigen der Gruppe II, jedoch mit Antigen III. Die zusätzlich mit Adjuvans versehenen Tiere wurden 8 Wochen p. i. mit je 1 ml Antigen III i. p. und am folgenden Tage mit 1 ml i. v. desensibilisiert. Von jedem Kaninchen aller 3 Versuchsgruppen entnahm ich über 8 Wochen wöchentlich einmal Blut.

3 weiteren Kaninchen (3 - 5 kg) wurde mit den Antigenen I - III insgesamt 16mal innerhalb von 4 Wochen eine steigende Antigenmenge von je 1-5 ml i. p. verabreicht. Nachdem 1 Woche nach der letzten Injektion Seren gewonnen worden waren, erfolgte eine erneute Immunisierung, um die erstrebte Antikörperbildung noch zu steigern.

Zur Gewinnung von Seren infizierter Tiere wurden 4 Kaninchen mit 20, 3 weitere mit 80 bzw. 60 und 30 Metazerkarien infiziert. Gleichzeitig verabreichte ich je 2 parasitenfreien Schafen 50, anderen 100 sowie 200 und 300 Zerkariencysten. Während von den 7 infizierten Kaninchen bis zu 6 Wochen jeweils wöchentlich einmal Blut genommen wurde, erfolgte die Serumgewinnung bei den 8 Schafen über einen Zeitraum von 15 Wochen. Es sollte damit die Beeinflussung der Antikörperbildung durch die Dauer der Infektion bzw. durch die verschiedenen Entwicklungsstadien erfasst werden.

Zur Auswertung benutzte ich die verschiedenen Antigene in der doppelten Konzentration, die zur Erzeugung des Maximaltiters bei einem Hochimmunserum gerade noch nötig war. Als Gebrauchsverdünnung bewährte sich 1:40 für Antigen I, 1:20 für Antigen II und III und 1:40 für den Alkoholextrakt.

Die Komplementbindungsreaktion wurde grundsätzlich nach dem Verfahren von Kolmer mit "Overnight fixation" durchgeführt. Konserviertes Meerschweinchenkomplement und den Ambozeptor (1:4000) bezogen wir von den Behringwerken. Das Komplement wurde vor jedem Ansatz ausgetestet. Ich benutzte die doppelte Komplementmenge, die nötig war, um gerade noch eine vollständige Hämolyse hervorzurufen.

Die Serumproben wurden zunächst im Wasserbad entweder bei 56°C für 1/2 Stunde oder bei 60°C für eine Stunde inaktiviert und mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung pH 7,2 in den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 usw. angesetzt. Die Hammelblutkörperchen benutzte ich zu 2 %. Bei jedem Ansatz lief eine Positiv-, eine Serum-, eine Puffer- und eine Antigen-Kontrolle mit. Als Einheit benutzte ich 0,04 ml.

B. Ergebnisse

Im Verlaufe meiner eigenen Untersuchungen prüfte ich mit der KBR die Seren der mit den verschiedenen Antigenen immunisierten Kaninchen, später die Seren der mit Metazerkarien infizierten Kaninchen. Schließlich sollte die Verläßlichkeit und Spezifität dieser serologischen Methode an den 8 leberegelbefallenen Schafen bestätigt werden.

1. Prüfung der Seren immunisierter Kaninchen mit der KBR

Die Versuchsgruppe I, aus 6 Versuchstieren und 1 Kontrolle bestehend, hatte in verschieden hohen Mengen (1 - 3 ml) Antigen I erhalten, das einen Vollextrakt aus 25 geschlechtsreifen Fasciola hepatica darstellt. Es ist interessant, daß bereits bei der ersten Serumtestung nach

12 Tagen in jedem Falle Titer nachgewiesen werden konnten. Die beiden mit 1 ml immunisierten Kaninchen hatten einen Titer von 1:10, diejenigen mit 2 ml schon 1:20 und die restlichen Tiere mit 3 ml einen Titer von 1:80. Der Titer stieg also mit der Immunisierungsdosis, fiel andererseits auch entsprechend langsamer wieder ab (Tabelle 1).

Es muß hervorgehoben werden, daß mit allen 3 Test-Antigenen Titer erreicht wurden. Sie hielten bei den mit Antigen III getesteten Seren am längsten an.

In der Versuchsgruppe II hatten 3 Kaninchen je 2 ml Antigen II (= Fascioliden-Extrakt ohne Genitalorgane) mit Freund'schem Adjuvans, die restlichen 3 Versuchstiere 3mal je 1 ml, 2 ml bzw. 3 ml Antigen ohne Adjuvans zur Immunisierung erhalten. Auch hier wurden die Antigene I - III ausgetestet. Die Serumtiter der mit Antigen II ohne Adjuvans immunisierten Kaninchen erreichten mit Antigen I 1:10, mit Antigen II lediglich 1:5, dagegen mit Antigen III 1:20. Es handelt sich hier um Höchsttiter, die nicht überschritten wurden (Tabelle 2). Dagegen stieg der Titer bei einem der mit Antigen II und Adjuvans behandelten Kaninchen auf 1:80 an. Diese Titerhöhe wurde mit Antigen I und II erst nach 47 Tagen, mit Antigen III bereits nach 26 Tagen erreicht. Die beiden anderen Versuchstiere starben.

Die Versuchsanordnung der Gruppe III entsprach derjenigen von Versuchsgruppe II. Allerdings war die Immunisierung mit Antigen III (= Stoffwechselantigen) mit bzw. ohne Adjuvans versucht worden. Allgemein lässt sich feststellen, daß die Seren bei den Testungen der 3 Antigene Titer bis 1:80 erreichten. Allerdings waren die Ergebnisse von Tier zu Tier unterschiedlich (Tabelle 3). Bei einem mit Adjuvans und Antigen III immunisierten Kaninchen stieg der Titer bis zum 60. Tage p. i. auf 1:160 an, bei einem anderen Kaninchen war bis zum 21. Tage kein Titer nachweisbar. Er stieg aber dann bis zum 45. Tage auf 1:80 an und fiel danach wieder ab.

Versuchstier Nr.	Antigen I-Menge (ml)		Titerhöhe zwischen dem 12. u. 60. Tag gegen																									
			Antigen I								Antigen II								Antigen III									
			12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.	12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.	12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.		
861	3 x 1	1:	10	5	5	5	5	5	-	-	10	5	5	5	5	-	-	-	10	10	10	10	10	5	5	-		
860	3 x 1	1:	10	5	-	-	-	-	-	-	10	5	5	5	5	5	-	5	10	10	10	10	5	10	5	5		
744	3 x 2	1:	20	10	-	10	20	5	-	10	20	10	-	10	20	10	5	10	20	20	-	10	20	10	10	10		
756	3 x 2	1:	5	-	-	-	5	5	5	5	-	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	5	10	10	10	10		
747	3 x 3	1:	5	-	5	5	5	-	-	-	5	5	5	5	5	-	-	5	5	-	5	-	-	-	-	-		
748	3 x 3	1:		80	80	80	80	80	80	80		80	80	80	40	20	20	20		40	40	40	40	40	40	20		
758	-	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tab. 1: Erreichte Titer nach Immunisierung mit verschieden hohen Mengen von Antigen I (Vollextrakt von Fasciola hepatica)

Versuchstier Nr.	Antigen II-Menge (ml)	Titerhöhe zwischen dem 12. u. 60. Tag gegen																									
		Antigen I									Antigen II								Antigen III								
			12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.	12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.	12.	19.	26.	33.	40.	47.	53.	60.
745	2+Adjuv.	1:	80	40	40			80	80		5	5	40			80	80		5	10	80			80	80	
732	2+Adjuv.	nach 3 Tagen gestorben																								
783	2+Adjuv.	nach 3 Tagen gestorben																								
753	3 x 1	1:	-	-	-	10	-	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	20	5	5	5
734	3 x 2	1:	10	10	10	10	10	10	5	5	10	5	5	5	5	5	-	-	10	10	10	20	5	5	5	5
908	3 x 3	1:	5	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	20	5	5	5	5
751	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 2: Titerhöhe nach Immunisierung von Kaninchen mit Antigen II (Fasciola hepatica-Extrakt ohne Genitalien) mit und ohne Adjuvans

Versuchstier Nr.	Antigen III-Menge (ml)	Titerhöhe zwischen dem 6. u. 60. Tag gegen																							
		Antigen I								Antigen II							Antigen III							
			6.	15.	21.	29.	38.	45.	60.	6.	15.	21.	29.	38.	45.	60.	6.	15.	21.	29.	38.	45.	60.
151	2+Adjuv.	1:	-	80	80	80	80	80	160	-	40	80	80	80	80	80	-	10	80	80	80	80	160
152	2+Adjuv.	1:	-	-	-	80	80	80	80	-	-	-	40	80	80	80	-	-	-	80	80	80	80
153	2+Adjuv.	1:	-	-	10	10	-	-	-	-	-	10	5	5	-	-	-	-	10	10	5	-	-
155	3 x 1	1:	-	5	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	-	-
158	3 x 2	1:	5	5	10	10	5	-	-	10	5	5	5	5	-	-	10	20	20	40	10	-	-
156	3 x 3	1:	-	10	80	80	80	20	-	5	5	80	20	20	-	-	-	10	80	80	80	-	-
157	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 3: Titerhöhe nach Immunisierung von Kaninchen mit Antigen III (Fasciola hepatica-Stoffwechselantigen) mit und ohne Adjuvans

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß zwar alle 3 Antigene in Kaninchen komplementbildende Antikörper hervorrufen, Antigen II jedoch am wenigsten wirksam war. Es muß daraus geschlossen werden, daß die Genitalien und Geschlechtsprodukte doch eine gewisse antigene Bedeutung haben. Es ist ferner interessant, daß der Titer in den mit Antigen und Adjuvans behandelten Kaninchen zwar langsamer, aber höher als in den mit Antigen allein behandelten Versuchstieren steigt. Schließlich zeigte sich ein deutlicher Einfluß der Immunisierungsdosis; denn je größer in den 3 Gruppen diese war, um so höher war der erreichte Maximaltiter.

Da eine Standardisierung der verschiedenen Antigene auf Grund ihres Proteingehaltes Fehlerquellen unterliegen kann, wählte ich die biologische Methode (BIGUET und Mitarb., 1965). Hierbei prüfte ich meine Antigene gegenüber Hochimmunseren von Kaninchen. Dabei untersuchte ich auch die von 3 Kaninchen nach 4-wöchentlicher Verabreichung steigender Mengen von Antigen I - III gewonnenen Hochimmunseren zusätzlich auch mit dem von MINNING und VOGEL (1950) beschriebenen Alkoholextrakt von Fasciola hepatica (= Antigen IV). Das Hochimmunserum I (von dem mit Antigen I immunisierten Versuchstier) erwies sich als antikomplementär. Das Hochimmunserum II hatte mit allen Antigenen einen Titer von 1:10 +++. Das Serum III reagierte mit Antigen III mit einem Titer von 1:40 ++++, mit Antigen II von 1:80 ++, mit Antigen I von 1:320, jedoch negativ mit dem Alkoholextrakt. Es kann also davon abgeleitet werden, daß der wirksame Anteil im Antigen I höher ist als bei Antigen II und III.

2. Prüfung der Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Kaninchen mit der KBR

Zur Erprobung der KBR und zur Überprüfung der verschiedenen Antigenzubereitungen waren 4 Kaninchen mit 20 (Gruppe A), zwei weitere Tiere mit 80 bzw. 60 und 30 Fasciola hepatica-Metazerkarien (Gruppe B) künstlich infiziert worden. In

etwa regelmässigen Abständen wurden Blutproben entnommen, die jeweiligen KBR-Titer (mit den Antigenen I - IV) der einzelnen Seren festgestellt sowie Tiere zur Bestätigung der Infektion getötet und seziert.

Die 4 Kaninchen der Gruppe A hatten 20 Metazerkarien erhalten. Lediglich bei 2 Versuchstieren war die künstliche Ansteckung geglückt. Bei ihnen wurden etwa 6 Wochen später bei der Autopsie juvenile Leberegel gefunden. Im Serum des Kaninchens Nr. 187, dessen Leber stark infiziert war, waren nur mit den Antigenen I und III Titer nachzuweisen. Während 8 Tage nach der Infektion die KBR noch negativ war, betrugen die Titer am 19. und 25. Tag 1:5 (Antigen I) bzw. 1:10 (Antigen IV). Am 34. und 41. Tag stiegen die Titer mit Antigen I auf 1:20 bzw. 1:40 und mit Antigen III unmittelbar auf 1:80. Pathologisch-anatomisch fielen die Vergrößerung der Leber und nekrotische Herde auf, mikroskopisch wurden juvenile Trematoden in und bei der Einwanderung in die Gallengänge nachgewiesen.

Anscheinend war die Infektion bei Kaninchen Nr. 142 nur gering angegangen. Die am 37. Tage erfolgte Sektion bestätigte diese Vermutung. Erst zum Zeitpunkt der Tötung trat ein Titer von 1:5 bei den Antigenen I - III auf.

Die 3 Versuchstiere der Gruppe B hatten unterschiedliche Mengen von Metazerkarien erhalten. Versuchstier Nr. 143 mit 30 Zerkarienzysten zeigte bei der Schlachtung ein starkes Angehen der Infektion. Die Titer stiegen vom 19. bis zum 28. Tag von 1:40 auf 1:80 bei Antigen I, von 1:40 auf 1:160 bei Antigen III an (Tabelle 4). Beim Kaninchen Nr. 165 war die mit 60 Entwicklungsstadien gesetzte Infektion ebenfalls stark angegangen. Die Titerhöhe betrug am 18. Tag 1:80 bzw. 1:20. Die Ansteckung des Versuchstieres Nr. 186 war auf Grund fehlender Veränderungen in der Leber kaum angegangen. Lediglich am 11. Tag war bei Antigen III ein Titer von 1:40

nachzuweisen.

Gruppe	Tier Nr.	Inf.Dosis (Metazer-karien)	Tage nach Infektion	Titer mit			
				A I	A II	A III	A IV
A	187	20	8	-	-	-	-
			19	1:5	-	1:10	-
			25	1:5	-	1:10	-
			34	1:20	-	1:80	-
			41	1:40	-	1:80	-
	142	20	9	-	-	-	-
			14	-	-	-	-
			20	-	-	-	-
			30	-	-	-	-
			37	1:5	1:5	1:5	-
B	143	30	8	-	-	-	-
			19	1:40	-	1:40	-
			25	1:40	-	1:40	-
			28	1:80	-	1:160	-
	165	60	8	-	-	1:20	-
			18	1:80	-	1:20	-

Tab. 4: KBR-Titer von Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Kaninchen mit Antigenen I - IV

Da diese Untersuchungen zeigten, daß künstliche Infektionen von Kaninchen nicht sicher angehen, wurde auf weitere Kaninchen verzichtet und mit Versuchen an Schafen begonnen. Die erzielten Ergebnisse aber lassen doch den Schluß zu, daß die Infektionsstärke einen gewissen Einfluß auf die Titerhöhe hat.

3. Prüfung der Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe mit der KBR

Es galt nunmehr, mit den vorgeprüften und teilweise bei Kaninchen positiv reagierenden Fasciola-Antigenen I - IV die Brauchbarkeit der KBR zur sicheren Diagnosestellung bei Schafen zu prüfen. 8 leberegelfreie etwa 20 - 25 kg schwere Schafe wurden deshalb mit unterschiedlichen Mengen von Metazerkarien infiziert und ihre Seren in verschiedenen Zeitabständen untersucht. Die bei Versuchsende (116 Tage nach der Ansteckung) erfolgte Sektion sollte Gewißheit über das Angehen der Infektion und die tatsächliche Stärke des Leberegelbefalls geben. Einzelheiten der Infektionsdosis sowie des Ergebnisses der parasitologischen Sektion zeigt Tabelle 5. Bei allen Versuchstieren war die künstliche Ansteckung gelungen. 60 Tage nach der Infektion schieden sämtliche Schafe Fasciola-Eier aus.

Schaf Nr.	Infektionsdosis (Metazerkarien)	Bei der Sektion ausgezählte Leberegel
306	50	9
307	50	8
301	100	22
308	100	16
309	200	36
311	200	18
314	300	4
315	300	29

Tab. 5: Infektionsdosis und Parasitenzahlen bei 8 Versuchsschafen

Die Prüfung der Seren mit dem Antigen I (Vollextrakt) ergab erstmals am 18. Tag bei den Schafen Nr. 307, 308 und 311 positive Reaktionen. Am 25. Tag wiesen alle Seren einen Titer von 1:5 bzw. 1:10 auf. Die Schafe Nr. 306 und 307 behielten die Titer bis zur Schlachtung, während die Versuchstiere Nr. 308, 309 und 314 danach negativ blieben.

Ebenfalls wieder negativ waren die Seren der Schafe 301 und 315. Ab dem 67. Tag zeigte das ebenfalls negativ gewordene Schaf Nr. 301 und ab 95. Tag das Tier Nr. 315 wieder einen Titer von 1:5 (Tabelle 6).

Mit Antigen II fand ich die ersten positiven Ergebnisse ebenfalls am 18. Tage bei den Schafen Nr. 307 und 309. Während Versuchstier Nr. 309 danach für die ganze Beobachtungszeit negativ blieb, wies Nr. 307 vom 60. bis 88. Tage wieder einen Titer von 1:5 auf. Die anderen Schafe reagierten sehr unterschiedlich (Tabelle 7). Die Versuchstiere Nr. 301, 308 und 314 blieben grundsätzlich negativ.

Mit dem als Antigen III bezeichneten Stoffwechselantigen erzielte ich zumindest bis zum 32. Tage bei allen Tieren Titer, wenn auch unterschiedlicher Höhe (1:10 - 1:80). Auffallend war der plötzliche Abfall der Titer ab dem 39. Tag (Tabelle 8). Lediglich die Schafe Nr. 306, 307 und 311 hatten noch Titer von 1:10. Alle übrigen Versuchstiere blieben bis zur Schlachtung negativ. Ein derartiges Ergebnis hatte ich nicht erwartet. Ich setzte deshalb ein zweites und drittes Mal die Komplementbindungsreaktion an. Diese beiden Ansätze verliefen sowohl mit dem bisherigen als auch mit einem frischen Antigen negativ.

Mit Antigen IV reagierten lediglich 3 Schafe erst in einem sehr späten Stadium der Infektion. Versuchstier Nr. 307 hatte einen Titer von 1:5 bzw. 1:10 zwischen dem 81. und 109. Tag p. i. und war dann bis zur Schlachtung negativ. Die Schafe Nr. 301 und 315 zeigten erst vom 102. Tage Titer von 1:5 bis 1:10 (Tabelle 9). Die Seren der übrigen Versuchstiere reagierten stets negativ.

Es zeigte sich, daß eine einmalige Infektion der Schafe lediglich geringe und im allgemeinen nicht lange andauernde Titer bedingt. Es wurde ferner deutlich, daß bei diesen Tieren die Intensität der Infektion keinen Einfluß auf die Stärke der Antikörperbildung hatte. Vergleicht man die Wirksamkeit der verschiedenen Antigene, so scheint ein Vollextrakt aus geschlechtsreifen Fascioliden (= Antigen I) die zuverlässigsten Resultate zu ergeben.

Titerwerte am . . . Tag nach der Infektion																		
Schaf Nr.		1.	11.	18.	25.	32.	39.	46.	53.	60.	67.	74.	81.	88.	95.	102.	109.	116.
306	1:	-	-	-	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
307	1:	-	-	10	10	5	5	5	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5
301	1:	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5
308	1:	-	-	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
309	1:	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311	1:	-	-	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
314	1:	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
315	1:	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5

Tab. 6: KBR-Titer von Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe - Antigen I (Wurm-Vollextrakt) -

Schaf Nr.		Titerwerte am . . . Tag nach der Infektion																
		1.	11.	18.	25.	32.	39.	46.	53.	60.	67.	74.	81.	88.	95.	102.	109.	116.
306	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	-	-	-	-
307	1:	-	-	5	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	-	-	-	-
301	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
309	1:	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311	1:	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-
314	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
315	1:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5

Tab. 7: KBR-Titer von Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe - Antigen II (Wurmantigen ohne Geschlechtsorgane) -

Schaf Nr.		Titerwerte am . . . Tag nach der Infektion																
		1.	11.	18.	25.	32.	39.	46.	53.	60.	67.	74.	81.	88.	95.	102.	109.	116.
306	1:	-	10	20	40	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-
307	1:	-	20	20	20	20	10	10	10	10	10	5	-	-	-	-	-	-
301	1:	-	10	10	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
308	1:	-	20	20	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
309	1:	-	40	40	80	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311	1:	-	20	40	40	40	10	10	10	5	5	5	-	-	-	-	-	-
314	1:	-	10	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
315	1:	-	-	10	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 8: KBR-Titer von Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe - Antigen III (Stoffwechselantigen) -

Schaf Nr.	Titerwerte am . . . Tag nach der Infektion																
	1.	11.	18.	25.	32.	39.	46.	53.	60.	67.	74.	81.	88.	95.	102.	109.	116.
306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:5	1:5	1:5	1:10	1:5	-
301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:5	1:10	1:10
308	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
309	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
314	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:5	1:5	1:5

Tab. 9: KBR-Titer von Seren experimentell mit Fasciola hepatica infizierter Schafe - Antigen IV (Alkoholextrakt) -

IV. Besprechung der Ergebnisse

Aus den Arbeiten von MINNING und FUHRMANN (1955) sowie von CARVAO GOMES und SILVA XAVIER (1956) konnte man entnehmen, daß Einzelfraktionen von Fasciola hepatica, gleichgültig ob sie chemisch ausgefällt oder von bestimmten Organen gewonnen wurden, keine so gute antigene Wirkung haben wie ein Gesamtwurmextrakt. Ich verwendete deshalb für meine vergleichenden Untersuchungen als Antigen I den mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnenen Extrakt von gewaschenen und danach zerkleinerten Fascioliden. Ich bin mir dabei bewußt, daß Proteine und Polysaccharide, wenn man sie überhaupt als Antigensubstanzen ansieht, durch fermentative Einwirkung aufgespalten werden und damit ihre antigenen Eigenschaften verlieren können. Durch eine rasche Trocknung des nicht zerkleinerten Wurmes wären eventuell diese fermentativen Prozesse aufgehalten worden. Die Lyophilisation wäre sicherlich eine schonendere und deshalb vielleicht wirkungsvollere Methode gewesen.

Antigen II gewann ich aus Leberegeln, aus denen zuvor die Geschlechtsorgane entfernt worden waren. THORPE (1965) hatte nämlich festgestellt, daß bei Fehlen von Keimdrüsen und Eiern für markierte Globuline von Fasciola hepatica die Fluoreszenz-Färbung nicht gelang. In Anlehnung an MINNING und Mitarb. (1958), die bei Verwendung von Stoffwechselantigen eine hohe Wirksamkeit sahen, wählte ich dies als Antigen III.

Diese 3 Antigene wurden nun mit der Komplementbindungsreaktion untersucht, um die Brauchbarkeit dieser Methode zur frühzeitigen Leberegeldiagnostik zu überprüfen. Für den Präzipitationstest wäre ein wesentlich höherer Antikörperspiegel nötig. Doch scheint der in den letzten Jahren auch in der Helminthologie erfolgende Ausbau der Präzipitation zur Gelpräzipitation diesem Verfahren eine größere Zuverlässigkeit beizumessen.

ELIAKIM und DAVIES (1954), URQUHART und Mitarb. (1954) sowie BIGUET und Mitarb. (1962) haben einen Anstieg von Antikörpern gegen einen Extrakt aus adulten Fasciola hepatica bei immunisierten Kaninchen beobachtet. Allerdings wurde von den Autoren kein Vergleich zwischen Titeranstieg und Titerhöhe angestellt bei Verwendung von Freund'schem Adjuvans und fraktionierten Antigengaben ohne Adjuvantien. Dies prüfte ich an Kaninchen vergleichend mit der Komplementbindungsreaktion. Dabei trat bei Zugabe von Adjuvans in jedem Falle ein höherer Antikörperspiegel auf, der bei Antigen III am deutlichsten ausgebildet war.

Es ist interessant, daß weder mit dem Serum künstlich infizierter Kaninchen noch experimentell angesteckter Schafe eine Reaktion mit dem Alkoholextrakt (Antigen IV) beobachtet wurde. Es reagierte lediglich mit Hochimmunseren positiv. Auch MINNING und Mitarb. (1958) bezweifeln die Zuverlässigkeit dieses Antigens, obwohl es sich bei natürlich mit Fasciola hepatica infizierten Menschen bewährte. Allerdings war es dort in einer wesentlich höheren Verdünnung benutzt worden.

Die Ergebnisse mit Antigen III gleichen den Beobachtungen von MINNING und Mitarb. (1958), soweit es sich um Kaninchenseren handelt. Es reagierte schon frühzeitig und mit einem hohen Titer. Dagegen waren die damit erzielten Resultate an Seren künstlich infizierter Schafe unsicher und sehr unterschiedlich. Da die Ergebnisse bei Schafen mit allen Antigenen schwankten, scheint die KBR für eine sichere Diagnosestellung, zumindest mit den verwendeten Antigenen, nicht geeignet.

V. Zusammenfassung

An 31 Kaninchen und 8 Schafen wurden unter Verwendung von 4 verschiedenen Fasciola hepatica-Antigenen vergleichende serologische Untersuchungen durchgeführt. Es sollte die Zuverlässigkeit der Komplementbindungsreaktion für die Diagnostizierung frischer Leberegelinfektionen, solange die parasitologische Kotuntersuchung noch negativ ist, überprüft werden.

Sowohl Vollextrakte geschlechtsreifer Leberegel als auch Extrakte von Fasciola hepatica ohne Geschlechtsorgane und Stoffwechselantigene bedingen bei Kaninchen komplementbindende Antikörper. Größere Immunisierungsdosen bewirkten höhere Maximaltiter.

Die Ergebnisse waren trotz mehrmaliger Wiederholung der Ansätze mit allen Antigenen bei Schafen nicht eindeutig. Die KBR ist deshalb für eine frühzeitige und sichere Feststellung des Leberegelbefalls bei Schafen, zumindest mit den verwendeten Antigenen, nicht geeignet.

VI. Literaturverzeichnis

1. Aygün, S. T., H. Baskaya: Anwendung der Allergie-Reaktion bei der Bekämpfung der Distomatose. Tierärztl. Rdsch. 45, 379-382, 1939.

2. Babadshanow, S. N., A. A. Tuchmanjanz: Die Gewinnung und Untersuchung eines vollwertigen Antigens aus Leberegeln. Usbek. biol. J. 5, 27-33, 1958; ref. Ldw. Zbl. Abt. IV, 1217, 1960.

3. Bénex, J., Lamy, L., J. Gledel: Étude de la réaction de fixation du complément à l'antigène distomien chez le mouton. Bull. Soc. Path. exot. 52, 83-87, 1959.

4. Biguet, J., Capron, A., P. Tran van Ky: Les antigènes de Fasciola hepatica. Étude électrophorétique et immunoelectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres helminthes. Ann. Parasit. hum. comp. 37, 221-231, 1962.

5. Biguet, J., Rosé, F., Capron, A., P. Tran van Ky: Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigenès vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immuno-électrophorèse. Rev. Immunol. (Paris) 29, 5-23, 1965.

6. Brocq-Roussau, Cauchemez, L., A. Urbain: La réaction de deviation du complement appliqué au diagnostic de la distomatose ovine. Bull. Soc. centr. med. vet. 74, 54, 1923; zit. Minning und Vogel, 1950.

7. Campbell, D. H.: The immunological specificity of a polysaccharide fraction from some common parasitic helminths. J. Parasit. 23, 348-353, 1937.

8. Carvao Gomes, F., A. Silva Xavier: A propósito de um novo caso de fascioliase hepática humana: ensaio sobre a técnica de fixacao do complemento para diagnóstico serológico. An. Inst. Med. Trop. (Lisboa) 13, 901-910, 1956.

9. Curasson, G.: Recherches sur le diagnostic des distomatoses à Fasciola hepatica et Amphistomum cervi par les réactions allergiques. Bull. Acad. vét. Fr. 8, 77-81, 1935.

10. Dawes, B.: Juvenile stages of Fasciola hepatica in the liver of the mouse. Nature (Lond.) 190, 646-647, 1961.

11. Eliakim, M., A. M. Davies: The complement-fixation test in bilharziasis. I. The value of different extracts of Schistosoma mansoni and Fasciola hepatica worms as antigens. Parasitology 44, 407-413, 1954.

12. Fairly, N. H., F. E. Williams: Observations on the complement fixation reaction in liver fluke (Fasciola hepatica) infection. J. Parasit. Bact. 26, 19-26, 1923; zit. Minning und Vogel, 1950.

13. Hoffman, A., Tr. Rivera: The precipitin test in Fasciola hepatica infection. Porto Rico Rev. Publ. Hlth. Trop. Med. 4, 589-598, 1929; zit. Minning und Vogel, 1950.

14. Ichihara, T., Susumi, S., T. Kuramoto: Studies on the diagnosis of fascioliasis. I. Antigens for the precipitation test. Jap. J. vet. Sci. 18, 119-129, 1956.

15. Dies.: Studies on the diagnosis of fascioliasis. III. Precipitation test for fascioliasis in goats. Jap. J. vet. Sci. 18, 137-140, 1956.

16. Kerr, K. B., O. L. Petkovich: Active immunity in rabbits to the liver fluke, Fasciola hepatica. J. Parasit. 21, 319-320, 1935.

17. Mazzotti, L.: La cuti-reacción y la intradermo-reacción aplicadas en un caso humano de Fasciola hepatica. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Mexico 3, 53-55, 1942; zit. Minning und Vogel, 1950.

18. Ders.: Aplicación de la intradermoreacción en casos humanos de infección por Fasciola hepática. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Mexico 9, 257-261, 1948; zit. Minning und Vogel, 1950.

19. Minning, W.: Zur serologischen Diagnose von Trematoden-infektionen. Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 157, 43-44, 1951.

20. Minning, W., H. Vogel: Immunbiologische und epidemiologische Untersuchungen bei 3 Fällen von menschlicher Fasciolose. Z. Tropenmed. Parasit. 1, 532-553, 1950.

21. Minning, W., G. Fuhrmann: Protein-, Kohlehydrat- und Lipoid-Fraktionen von Fasciola hepatica als KBR-Antigene. Z. Tropenmed. Parasit. 6, 92-99, 1955.

22. Minning, W., Newsome, J., D. L. H. Robinson: Trematoden-Stoffwechselprodukte als Antigene. Z. Tropen-med. Parasit. 9, 335-342, 1958.

23. Morenas, L.: Les réactions d'allergie cutaneé dans la distomatose humaine à Fasciola hepatica cuti et intra-dermo-reaction. C. R. Soc. Biol. (Paris) 137, 563-565, 1943; zit. Minning und Vogel, 1950.

24. Morenas, L.: Le diagnostic biologique de la distomatose hépatique: essai de cuti et d'intradermo-réactions. Lyon méd. 171, 51-56, 1944.

25. Oliver González, J., Rivera Anaya, J. D., J. Martinez de Jesús: Intradermal reactions in cattle to antigen prepared from Fasciola hepatica. Puerto Rico J. publ. Hlth. 26, 121-124, 1950.

26. Ono, M., S. Watanabe: Studies on the polysaccharides in the antigen of skin in test for bovine fascioliasis. Jap. J. vet.Sci. 18, 141-148,1956.

27. Paccanaro, A.: La deviazione del complento nelle distomatosi. Clin. Vet. 32, 24-27, 1909; zit. Minning und Vogel, 1950.

28. Patnaik, B., K. M. Das: Diagnosis of fascioliasis in cattle by intradermal allergic test. Cornell. Vet. 51, 113-123, 1961.

29. Pautrizel, R., Bailenger, J., Duret, J., J. Tribouley: Utilisation d'un antigène distomien délipide dans le diagnostic allergique de la distomatose à Fasciola hepatica. Rev. Immunol. (Paris) 26, 167-174, 1962; ref. Helminth. Abstr. 34, 381, 1965.

30. Rivera-Anaya, J. D., Ciordia, H., J. Martinez de Jesús: Comparative efficiency of intradermal and precipitin techniques in the diagnosis of fascioliasis of cattle in Puerto Rico. Bull. Puerto Rico Agric. Exp. Stat. Rio Piedras 115, 1-20, 1953.

31. Servantie, L.: Recherche sur la deviation du complement dans la distomatose humaine. C. R. Soc. Biol. (Paris) 84, 699-700, 1921.

32. Sewell, M. M. H.: The immunology of fascioliasis. II. Qualitative studies on the precipitin reaction. Immunology 7, 671-680, 1964.

33. Sievers, H. K., R. Oyarzun: Diagnostic de la distomatose hépatique par la réaction allergique. C. R. Soc. Biol. (Paris) 110, 630-632, 1932.

34. Sobiech, T.: Rozpoznanie motylicy u bydla za pomoca odczynu śródskórnego. Pol. Arch. weteryn. 1, 213-230, 1951.

35. Soulsby, E. J. L.: Skin hypersensitivity in cattle infested with Fasciola hepatica. J. comp. Path. 64, 267-274, 1954.

36. Spuhler, V., Moosbrugger, G. A., K. Meyer: Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum der mit Leberegel behafteten Rinder. Schweiz. Arch. Tierheilk. 100, 610-615, 1958.

37. Stickdorn, E.: Nachweis von Trematodeninvasionen mit Hilfe immunobiologischer Methoden unter besonderer Berücksichtigung der Präzipitation bei Leberegelbefall. Vet. med. Diss. Hannover, 1939.

38. Szaflarski, J.: Przyczynek do serologicznego rozpoznawania motylicy owczei. Med. weteryn. 2, 217-219, 1946.

39. Szaflarski, J., J. Nawrocki: Zastosowanie frakcji wielocukrowej i bialkowej przy diagnostyce motylicy u owiec. Med. weteryn. 7, 16-19, 1951.

40. Thorpe, E.: An immunocytochemical study with Fasciola hepatica. Parasitology 55, 209-214, 1965.

41. Trawiński, A.: Über Nachweis der Leberfäule mittels der Präzipitationsmethode. Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 139, 90-95, 1937.

42. Urquhart, G. M., Mulligan, W., F. W. Jennings: Artificial immunity to Fasciola hepatica in rabbits. I. Some studies with protein antigens of F. hepatica. J. infect. Dis. 94, 126-133, 1954.

43. Wagner, O.: Hautallergie und Komplementbindungsreaktion bei Trematodeninfektionen. Z. Immun.-Forsch. 84, 225-236, 1935.

44. Weinberg, M.: Recherche des anticorps specifiques dans la distomatose et la cysticercose. C. R. Soc. Biol. (Paris) 66, 219, 1909; zit. Minning und Vogel, 1950.

45. Wikerhauser, T.: Immunobiologic diagnosis of fascioliasis. II. The in vitro action of immune serum on the young parasitic stage of F. hepatica - a new precipitin test for fascioliasis. Vet. Arh. (Zagreb) 31, 71-80, 1961.

46. Wikerhauser, T., V. Bartulić: Immunobiološka dijagnostika fascioloze. I. O vrijednosti somatskog, polisaharidnog i metaboličkog antigena za intrakutani test kod goveda. Vet. Arh. (Zagreb) 31, 1-7, 1961.

Lebenslauf

Am 15. Juni 1936 wurde ich, Pramod Behari Mathur, als Sohn des Kaufmannes Gopal Behari Mathur und seiner Ehefrau Suraj Mukhi in Madanpur (Mainpuri) Indien geboren. Ich besuchte die Grundschule in Schikohabad (U. P.), die R. E. I. Highersecondary School und das College in Dayalbagh, Agra, wo ich die Reifeprüfung am 8. Juni 1954 bestand. Das Studium der Veterinärmedizin absolvierte ich an der Universität in Agra. Dort erhielt ich am 22. November 1958 den Grad eines Bachelor of Veterinary Science and Animal Husbandry und am 2. Dezember 1961 den Grad eines Master of Veterinary Science. Anschließend war ich drei Jahre als Assistent am Indian Veterinary Research Institute in Izatnagar (U. P.) sowie ein weiteres Jahr im Department of Animal Husbandry in Mandi (H. P.) tätig. Seit 1. Mai 1965 bin ich als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes im Institut für Parasitologie der Freien Universität Berlin wissenschaftlich tätig.